

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 049**

51 Int. Cl.:

C12N 1/38 (2006.01)

C12P 17/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2012 PCT/EP2012/051084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2012 E 12701347 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2670839**

54 Título: **Uso de glucosa tostada para la producción fermentativa de taxtomina**

30 Prioridad:

31.01.2011 EP 11152693

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.02.2018

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

BANKE, NIELS

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 656 049 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de glucosa tostada para la producción fermentativa de taxtomina

5 El campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un método para aumentar del rendimiento de un compuesto de interés en una fermentación utilizando glucosa tostada como un sustrato de alimento.

10 Estado de la técnica

[0002] Comercialmente es de importancia clave continuamente aumentar el rendimiento de un compuesto de interés producido por fermentación microbiana en la escala industrial.

15 [0003] Si la productividad se puede aumentar, esta liberará la capacidad de producción de otros compuestos y reducirá la necesidad de nuevas inversiones en la producción.

[0004] Se conoce (Process Biochemistry, vol. 27, no. 6, 1992, page 327-334) que el almidón hidrolizado ácido puede ser un inductor para la producción de celulasa por *Trichoderma reesei*.

20 También se conoce esa celobiosa en un inductor para la producción de taxtomina por *Streptomyces* (Physiological and Molecular Plant Pathology, 2007 71 (1-3):18-25).

Resumen de la invención

25 [0005] Se ha descubierto sorprendentemente que el rendimiento de un compuesto de interés se puede aumentar muy significativamente añadiendo una solución de glucosa tostada al medio de cultivo, así reivindicamos:

Un método para la fermentación de un microorganismo, que produce una taxtomina de interés, en un medio de cultivo que comprende:

30 añadir una solución de glucosa tostada al medio de cultivo, donde la solución de glucosa tostada es una solución de glucosa que ha sido tratada con ácido y calentada a una temperatura de al menos 90 grados Celsius y donde la solución de glucosa tiene una concentración de al menos 500 g/l.

Divulgación detallada de la invención

35 [0006] La presente invención trata el aumento de rendimiento de una taxtomina en fermentaciones industriales.

[0007] El microorganismo puede ser cualquier microorganismo útil para fermentaciones industriales, en particular, una bacteria o un hongo.

40 Bacteria

[0008] La expresión de bacteria del compuesto de interés según la invención puede ser una bacteria de cualquier género.

45 [0009] En una forma de realización preferida, el compuesto de interés se puede obtener a partir de una bacteria gram positiva, en particular, a partir de una cepa de *Bacillus* o *Streptomyces*.

50 [0010] En una forma de realización preferida, la cepa de *Bacillus* se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

55 [0011] En otra forma de realización preferida la cepa de *Streptomyces* es seleccionada del grupo que consiste en *Streptomyces scabies*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces turgidiscabies*, *Streptomyces murinus* y *Streptomyces acidiscabies*; en particular, la cepa de *Streptomyces* se selecciona del grupo que consiste en *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* y *Streptomyces turgidiscabies*; especialmente, la cepa de *Streptomyces* es una cepa *Streptomyces acidiscabies*.

60 [0012] El compuesto de interés puede ser obtenido a partir de una bacteria gram negativa, en particular, a partir de una cepa *Escherichia sp.*, por ejemplo, *Escherichia coli* o a partir de una cepa *Pseudomona sp.*

Hongo

65 [0013] El hongo que expresa el compuesto de interés según la invención puede ser un hongo de cualquier género incluyendo levadura. En una forma de realización preferida, el hongo es un hongo filamentosos.

[0014] Según la invención, el hongo puede especialmente ser una cepa fúngica filamentosa seleccionada del grupo que consiste en *Achlya*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cephalosporium*, *Cochliobolus*, *Cryptococcus*, *Endothia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Piromices*, *Podospora*, *Pyricularia*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium* y *Trichoderma*, en particular, el hongo puede ser del grupo que consiste en *Achlya*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cochliobolus*, *Endothia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Podospora*, *Pyricularia* y *Trichoderma*.

[0015] En otra forma de realización preferida, el hongo es una cepa de *Aspergillus*, en particular, el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

[0016] En una forma de realización preferida especialmente el hongo es una cepa de *Trichoderma*, particularmente una cepa *Trichoderma reesei*.

[0017] Las cepas bacterianas y fúngicas de estas especies son accesibles fácilmente al público en un número de colecciones de cultivo, tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y colección de Patentes de Cultivos del Servicio de Investigación para la Agricultura, centro de investigación Regional del Norte (NRRL).

Compuesto de interés

[0018] El compuesto de interés según la invención es una taxtomina.

Taxtomina

[0019] Un compuesto de interés según la invención es una taxtomina.
Las taxtominas son un grupo conocido de fitotoxinas.

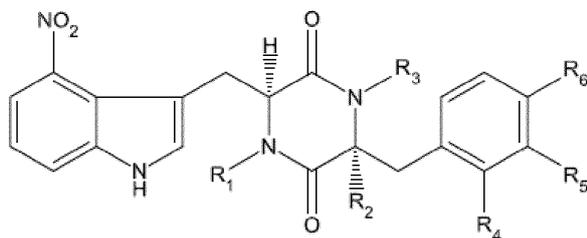
[0020] Las taxtominas incluyen cualquier tipo de una familia de dipéptidos cíclicos, tales como 2,5-dioxopiperacinas que contienen 4-nitroindol-3-il.

Las taxtominas adecuadas incluyen agentes descritos como dipéptidos cíclicos con la estructura básica ciclo-(L-4-nitrotriptofil-L-fenilalanil).

En ejemplos de realización, las fracciones de diquetopiperacina adecuadas pueden ser n-metiladas e incluyen congéneres que soportan grupos hidroxilo alfa y anillo carboxílico fenilalanil.

Los ejemplos no limitativos de taxtominas adecuadas para uso conforme a la presente invención incluyen taxtomina A, isómero orto de taxtomina A, taxtomina B y C-14 deoxitaxtomina B (taxtomina D) y derivados de cualquiera de estos.

[0021] Las taxtominas incluyen la fórmula siguiente:



[0022] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo o H.

[0023] En los ejemplos de realización, R₂ es hidroxil o H.

[0024] En los ejemplos de realización, R₃ es metilo o H.

[0025] En los ejemplos de realización, R₄ es hidroxil o H.

[0026] En los ejemplos de realización, R₅ es hidroxil o H.

[0027] En los ejemplos de realización, R₆ es hidroxil o H.

[0028] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es metilo, R₄ es H, R₅ es hidroxil y R₆ es H.

[0029] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es metilo, R₄ es hidroxil, R₅ es H y R₆ es H.

[0030] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es H, R₃ es H, R₄ es H, R₅ es H y R₆ es H.

[0031] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es metilo, R₄ es H, R₅ es H y R₆ es H.

[0032] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es H, R₃ es metilo, R₄ es H, R₅ es H y R₆ es H.

[0033] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es H, R₄ es H, R₅ es H y R₆ es H.

[0034] En ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es metilo, R₄ es H, R₅ es H y R₆ es hidroxil.

[0035] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es metilo, R₄ es H, R₅ es hidroxil y R₆ es hidroxil.

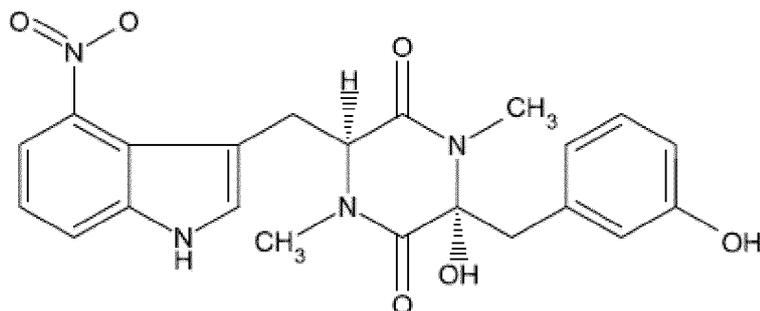
[0036] En los ejemplos de realización, R₁ es metilo, R₂ es hidroxil, R₃ es H, R₄ es H, R₅ es hidroxil y R₆ es H.

[0037] En los ejemplos de realización, R₁ es H, R₂ es hidroxil, R₃ es metilo, R₄ es H, R₅ es hidroxil y R₆ es H.

[0038] En los ejemplos de realización, R₁ es H, R₂ es H, R₃ es H, R₄ es H, R₅ es H y R₆ es H.

[0039] La taxtomina A está compuesta de 2,5-dioxopiperacina que contiene 4-nitroindol-3-il y es la taxtomina predominante producida por *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* y *Streptomyces turgidiscabies*, con adiciones de anillo-m de fenilalanil y alfa-c hidroxilo.

La composición química comprende o consiste en:



Modificación del microorganismo de interés

[0040] El microorganismo que produce el compuesto de interés ha sido transformado típicamente con un constructo de expresión que comprende un promotor operativamente enlazado a un gen que codifica el compuesto de interés.

Varios promotores se han usado y descrito en la técnica.

[0041] Es beneficioso normalmente también tener más de una copia del compuesto que codifica el compuesto de interés para hacer el rendimiento lo más alto posible.

[0042] El promotor es preferiblemente un promotor inducible.

Fermentaciones

[0043] La presente invención puede ser útil para cualquier fermentación en la escala industrial, por ejemplo, para cualquier fermentación que tenga medios de cultivo de al menos 50 litros, preferiblemente al menos 100 litros, más preferiblemente al menos 500 litros, aún más preferiblemente al menos 1000 litros, en particular al menos 5000 litros.

[0044] El microorganismo se puede fermentar por cualquier método conocido en la técnica. El medio de fermentación puede ser un medio complejo que comprenda nitrógeno complejo y/o fuentes de carbono, tales como harina de soja, proteína de soja, hidrolizado de proteínas de soja, harina de semillas de algodón, licor de maceración del maíz, extracto de levadura, caseína, hidrolizado de caseína, proteína de patata, hidrolizado de proteínas de patata, melaza y similar.

El medio de fermentación puede ser unos medios definidos químicamente, por ejemplo, tal y como se define en la WO 98/37179.

[0045] La fermentación se puede realizar como un lote, un lote alimentado, un lote alimentado repetido o un proceso de fermentación continua.

5 Condiciones limitadas de carbono

[0046] Puede ser una ventaja según la invención usar una fermentación limitada de carbono.

10 [0047] Condiciones limitadas de carbono significa que el microorganismo tiene solo carbono suficiente para crecer con un índice de crecimiento específico donde dicho índice de crecimiento específico es inferior al índice de crecimiento específico máximo.

Glucosa tostada

15 [0048] La presente invención divulga la ventaja sorprendentemente alta añadiendo una solución de glucosa tostada a un medio de cultivo en vez de solo añadir una solución de glucosa a un medio de cultivo.

20 [0049] La solución de glucosa tostada es una solución de glucosa que ha sido tratada con ácido y calentada a una temperatura de al menos 90 grados Celsius y donde la solución de glucosa tiene una concentración de al menos 500 g/l.

[0050] En una forma de realización preferida, la solución de glucosa primero se trata en ácido y luego se calienta a una temperatura de al menos 90 grados Celsius.

25 [0051] La solución de glucosa debería tener una alta concentración de glucosa.
En una forma de realización preferida, la solución de glucosa tiene una concentración de mínimo 500 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 550 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 600 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 650 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 700 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 750 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 800 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 850 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 900 g/l; preferiblemente al menos 950 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 1000 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 1050 g/l; preferiblemente una concentración de al menos 1100 g/l; en particular, la solución de glucosa tiene una concentración de 500 g/l a 1200 g/l; especialmente la solución de glucosa tiene una concentración de 600 g/l a 1200 g/l; especialmente la solución de glucosa tiene una concentración de 700 g/l a 1200 g/l; e incluso más preferiblemente la solución de glucosa tiene una concentración de 800 g/l a 1200 g/l.

30 [0052] Cualquier ácido conocido en la técnica se puede utilizar para el tratamiento con ácido.
Un ácido preferido es ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido cítrico; en particular, ácido fosfórico o ácido sulfúrico.

40 [0053] Los resultados de tratamiento con ácido en una solución de glucosa - antes el tratamiento con calor - con un pH menor que 4.5; en particular, con un pH menor que 4.0; en particular con un pH menor que 3.5; en particular con un pH menor que 3.0; en particular con un pH menor que 2.5; en particular con un pH menor que 2.0; en particular con un pH menor que 1.5; en particular con un pH menor que 1.0; especialmente el pH está en el rango de pH 0.5 a pH 4.5; e incluso más preferiblemente el pH está en el rango de pH 0.5 a pH 3.5.

45 [0054] La solución de glucosa tratada con ácido se calienta a una temperatura de al menos 90 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 95 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 100 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 101 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 102 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 103 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 104 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 105 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 106 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 107 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 108 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 109 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 110 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 111 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 112 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 113 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 114 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 115 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 116 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 117 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 118 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 119 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 120 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 121 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 122 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 123 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 124 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 125 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 130 grados Celsius; en particular a una temperatura de al menos 135 grados Celsius; preferiblemente a una temperatura en el rango de 90 a 135 grados Celsius; en particular a

una temperatura en el rango de 100 a 135 grados Celsius; e incluso más preferiblemente a una temperatura en el rango de 110 a 130 grados Celsius.

5 [0055] Las temperaturas altas se obtienen típicamente usando un autoclave.
Varios tipos de autoclaves se conocen en la técnica.

Recuperación del compuesto de interés

10 [0056] El producto según la invención puede ser un producto bruto; por ejemplo, el producto puede ser obtenido directamente del caldo de fermentación.

[0057] Un aspecto adicional de la invención concierne al procesamiento del caldo de fermentación aguas abajo. Después de que el proceso de fermentación se haya cerrado, el compuesto de interés se puede recuperar del caldo de fermentación, usando tecnología estándar desarrollada para el compuesto de interés.

15 [0058] La tecnología de tratamiento aguas abajo pertinente para ser aplicada depende de la naturaleza del compuesto de interés.

20 [0059] Un proceso para la recuperación de un compuesto de interés a partir de un caldo de fermentación típicamente implicará (pero no se limita a) uno o varios de los siguientes pasos:

- 1) pretratamiento de caldo (por ejemplo, tratamiento de pH y/o floculación)
- 2) eliminación de células y otro material sólido de caldo (separación primaria)
- 3) filtración
- 4) concentración
- 25 5) filtración
- 6) estabilización y estandarización.

[0060] Aparte de las operaciones unitarias enumeradas arriba, un número de otros procedimientos y pasos de recuperación se pueden aplicar, por ejemplo, variación en la temperatura, cristalización, tratamiento de la solución que comprende el compuesto de interés con carbono activo y uso de varios adsorbentes.

[0061] La invención posteriormente se ilustra en el siguiente ejemplo, que no se destina a ser de cualquier modo limitativo al ámbito de la invención como se ha reivindicado.

35 Ejemplo 1

Efecto de glucosa tostada en la producción de taxtomina A de *Streptomyces acidiscabies*

40 [0062] El siguiente ejemplo muestra que el uso de una solución de glucosa tostada, en vez de una solución de glucosa, produce una inducción fuerte de la producción de taxtomina A en *Streptomyces acidiscabies*.

Medios:

45 [0063]
2 G/L extracto de levadura Difco
0.025g/L CuSO₄ 5H₂O
2.44 G/L Na₂HPO₄ monohidrato
7.5 G/L K₂HPO₄
2.5 G/L (NH₄)₂SO₄
50 2 G/L ácido cítrico
2.5 G/L MgSO₄ 7H₂O
0.25 G/L CaCO₃
3 G/L K₂SO₄
100 MM tampón MES (20 g/l)

55 Premezcla (solución de oligoelementos - ver receta abajo) 10 mL/L pH<6.0

[0064] 500 ml frascos de agitación de vidrio con 2 baffels fueron usados con medios de 100 ml.

60 [0065] 0.1 ml P2000 antiespumante se añadió a cada matraz.

Receta de solución de oligoelementos de premezcla

65 [0066]
0.4 g/L ZnSO₄ 7H₂O

ES 2 656 049 T3

0.2 g/L CuSO₄ 5H₂O
1.5 g/L FeSO₄ 7H₂O
0.6 g/L MnSO₄ H₂O
20 g/L ácido cítrico

5

[0067] Después de un tratamiento térmico (121 grados Celsius; 20 min) la fuente de carbohidrato se añadió a los frascos de agitación.

Fuentes de carbohidrato:

10

[0068] 2.44 ml solución de glucosa

[0069] 820 g/l glucosa, 1H₂O; calor tratado (sometido a autoclave) 1 hora a 121 grados Celsius

o

15

2.13 ml solución de glucosa tostada - tratada con ácido y calor de la siguiente manera:

940 g/l glucosa, 1 H₂O

87.2 g/l 16% H₃PO₄

0.6 g/l SB 2121 (antiespumante)

El calor tratado (sometido a autoclave) durante 1.5 hora a 121 grados Celsius

20

[0070] Los frascos de agitación fueron inoculados con 1 ml de un cultivo de inóculo de crecimiento fuerte (ver detalles por abajo).

Hacer inóculo para los cultivos:

25

[0071] La cepa fue inoculada a partir de un frasco crío y primero creció en un agar PDA durante 3 días a 28 grados Celsius.

Una colonia individual fue extraída del agar y se usó para inoculación de un matraz de agitación con los medios descritos anteriormente y la glucosa como fuente de carbohidrato.

30

El matraz de agitación fue incubado durante 2 días a 28 grados Celsius 200 r.p.m.; después de 1 día el crecimiento de pared fue registrado en el medio/cultivo por un corto periodo de agitación manual vigorosa. Este cultivo se usó para inóculos de los frascos de agitación descritos anteriormente.

[0072] El crecimiento y producción de taxtomina A fue medido después de 2 días de cultivo:

35

Fuente de carbohidrato	Biomasa [OD 650 nm]	Taxtomina A [%]
Glucosa	10.7	100
Glucosa tostada	9.9	170

Conclusión:

40

[0073] Basado en OD 650 que correlaciona bien con la masa seca celular, las dos fuentes de carbono suponen aproximadamente el mismo nivel de biomasa, mientras el nivel de taxtomina A es sorprendentemente más alto en el cultivo con glucosa tostada como la fuente de carbohidrato.

[0074] El rendimiento es 170 % en comparación con el cultivo con glucosa como fuente de carbohidrato.

REVINDICACIONES

1. Método de fermentación de un microorganismo, que produce taxtomina de interés, en un medio de cultivo que comprende:
- 5 añadir una solución de glucosa tostada al medio de cultivo, donde la solución de glucosa tostada es una solución de glucosa que ha sido tratada con ácido y calentada a una temperatura de al menos 90 grados Celsius y donde la solución de glucosa tiene una concentración de al menos 500 g/l.
2. Método, según la reivindicación 1, donde la taxtomina se selecciona entre taxtomina A, isómero orto de taxtomina A, taxtomina B y C-14 deoxitaxtomina B (taxtomina D) y derivados de cualquiera de estos.
- 10 3. Método, según la reivindicación 1 o 2, donde el microorganismo es una bacteria o un hongo.
4. Método, según la reivindicación 2, donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus*, *Streptomyces*, *Escherichia* y *Pseudomonas*.
- 15 5. Método, según la reivindicación 4, donde la bacteria es una cepa *Streptomyces* seleccionada del grupo que consiste en *Streptomyces scabies*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces turgidiscabies*, *Streptomyces murinus* y *Streptomyces acidiscabies*.
- 20 6. Método, según la reivindicación 3, donde el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Achlya*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cochliobolus*, *Endothia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Podospora*, *Pyricularia* y *Trichoderma*.
- 25 7. Método, según la reivindicación 1, donde la fermentación es un lote, un lote alimentado, un lote alimentado repetido o una fermentación continua.
8. Método, según la reivindicación 1, donde el tratamiento ácido produce una solución de glucosa con un pH menor de pH 4.5.
- 30 9. Método, según la reivindicación 1, donde la solución de glucosa se trata con ácido y luego se calienta a una temperatura de al menos 90 grados Celsius.
- 35 10. Método, según la reivindicación 1, donde la solución de glucosa tiene una concentración de 500 g/l a 1200 g/l.
11. Método, según la reivindicación 1, donde la taxtomina se recupera después de la eliminación del microorganismo.